

菲律宾蛤仔的精子发生和精子超微结构

代培芳 饶小珍 陈寅山

(福建师范大学生物工程学院 福州 350007)

摘要: 用透射电镜研究了菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 精子结构和精子发生过程中细胞形态结构的变化及细胞器的演变规律。菲律宾蛤仔雄性生殖细胞的形态由椭圆形渐变为辣椒状, 细胞核的形态由椭圆形逐渐拉长, 渐变为锥形。染色质的凝集经历: 小颗粒团块状→较大颗粒均匀状→粗颗粒均匀状的过程。线粒体在演化过程中数量先增多后逐渐减少, 嵴数逐渐增多, 电子密度和体积逐渐增大。高尔基体在初级精母细胞期已经发育, 随后的各期中发育良好, 分泌旺盛。精细胞Ⅱ期, 高尔基体分泌的潴泡开始融合, 形成前顶体囊。精细胞Ⅲ期, 高尔基体的分泌物仍不断融合。精细胞分化的后期, 前顶体囊逐渐发育形成顶体。菲律宾蛤仔成熟精子呈长辣椒状, 为原生型, 由头部、中段和尾部构成。头部的顶体为细长柱形, 末端渐细, 电子密度较小; 细胞核为锥形; 中段线粒体 4 个, 尾部鞭毛为典型的“9 + 2”型结构。此外在成熟精子线粒体环横切面有一特殊“风车状”结构。

关键词: 菲律宾蛤仔; 精子; 精子发生; 超微结构

中图分类号: S917; Q954 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)02-26-07

Ultrastructural Studies on Spermatozoon and Spermatogenesis of *Ruditapes philippinarum*

DAI Pei-Fang RAO Xiao-Zhen CHEN Yin-Shan

(Bioengineering College, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

Abstract: The ultrastructure of spermatogenesis and spermatozoon of *Ruditapes philippinarum* was observed with transmission electron microscopy. During the spermatogenesis of *R. philippinarum*, the morphological changes of cells and the transformation of cell organelles were described. The spermatogenetic cells gradually elongate from ellipse- to chili-shaped, and the their nuclei change from ellipse- to cone-shaped. Chromatin condensation includes the following stages: small particular chromatin blocks, a little large and even particular chromatin, and larger and even particular chromatin. Mitochondria gradually fuse and increase in size and electronic density. Golgi bodies are found to be developed in the phase of primary spermatocyte, and in the following stages they develop very well and exert secretory functions. Proacrosomal vesicle begin to form at spermatid II stage. Mature spermatozoon, like a long chili with a tail, belongs to primitive type, consisting of head, middle piece and tail. The acrosome in the head is long-cylindrical in shape and has low electronic density. The nucleus is cone-shaped. Middle piece consists of 4 ellipsoidal mitochondria and a pair of centrioles vertical to each other. The flagellum has a standard “9 + 2” microtubular structure. In

第一作者介绍 代培芳, 女, 24岁, 硕士研究生; 研究方向: 动物生态学; E-mail: jijjht@163.com.

收稿日期: 2003-08-10, 2004-01-15

addition, a pinwheel-like structure in the ring of mitochondria is found.

Key words: *Ruditapes philippinarum*; Spermatogenesis; Spermatozoon; Ultrastructure

精子发生是生物学中的重要问题之一。精子的形态结构及其运动方式与受精过程密切相关,是受精生物学的一个重要内容。精子的形态结构也是进行动物分类的依据之一。海洋动物精子的细微结构变化和鞭毛运动性的变异亦可作为检测海洋环境污染的指标^[1]。软体动物双壳类的精子发生和精子结构国外已有许多研究^[1-4],国内近年也做了不少工作,如合浦珠母贝^[5]、栉孔扇贝^[6]、贻贝^[7]、三角帆蚌^[8]、青蛤^[9]等等的研究。菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)是一种重要的海产经济贝类,是我省四大养殖贝类之一,对它的食性和生活史已有很多研究^[10,11],但精子发生和精子超微结构的研究尚没有报道。菲律宾蛤仔精子发生及精子超微结构的研究,不但对人工育种的生产实践具有指导作用,而且能为双壳类的受精生物学及相关基础研究提供参考资料。

1 材料与方 法

材料于 2002 年 10 月从福州程埔市场购得。取菲律宾蛤仔活体的精巢组织,迅速用 3% 戊二醛-1.5% 多聚甲醛液 4℃ 固定 5 d,充分漂洗,1% 锇酸-1.5% 亚铁氰化钾固定 1.5 h,漂洗,乙醇-丙酮梯度脱水,环氧树脂 618 包埋,瑞典 LKB-V 型超薄切片机切片,醋酸铀柠檬酸铅双重染色切片,日立 Hu-12A 透射电镜观察与摄影。

2 结 果

菲律宾蛤仔的精子发生是不同步的。切片中存在精子发生过程中的不同发育阶段的细胞(图版 I:1)。

2.1 精原细胞 细胞椭圆形,数量较少,大小约为 $8\ \mu\text{m} \times 4\ \mu\text{m}$,核形与胞体一致,大小约为 $6\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$ 。核内电子密度稍大,存在 1~2 个核仁,直径约为 $1\ \mu\text{m}$;核内染色质呈小块状,少量均匀散布,核膜处紧贴一薄层染色质。胞质电

子密度稍小。线粒体数量很少,大小约为 $0.7\ \mu\text{m} \times 0.4\ \mu\text{m}$,其内电子密度很小,嵴数非常少。管状的粗面内质网也是另一种重要的细胞器,还存在许多游离的核糖体颗粒(图版 I:2)。

2.2 初级精母细胞 细胞椭圆形,核形与胞体一致,胞体与核的大小较前一期没有显著增加。早期的初级精母细胞中仍然有核仁的存在。核质与胞质电子密度近似且较小,核内稀疏散布着小团块染色质,数量较精原细胞多,核膜边缘处仍有一薄层染色质。细胞质中细胞器数量显著增多,尤其是线粒体,其数量大增,有的横切面可见到近 20 个线粒体,大小没有明显变化,线粒体内电子密度和嵴数均增加;管状或小囊泡状的粗面内质网也广泛分布;初级精母细胞开始出现高尔基体,其片层和潴泡围成近环状结构(图版 I:3,7)。

2.3 次级精母细胞 细胞椭圆形,较初级精母细胞小,大小约为 $7\ \mu\text{m} \times 4\ \mu\text{m}$ 。核形与胞体一致,大小约为 $6\ \mu\text{m} \times 3.5\ \mu\text{m}$ 。初级精母细胞核中小团块状的染色质凝集为较大的团块状。细胞质中线粒体的数量较多,体积稍增大,嵴数渐增多增长。管状或囊泡状的粗面内质网以及游离核糖体仍存在。高尔基体片层结构两侧分泌有大量潴泡,发育较好(图版 I:4,8)。

2.4 精细胞 次级精母细胞经第二次成熟分裂形成精细胞。根据染色质的凝集状况,线粒体和高尔基体等细胞器的发育及胞质的特征变化将精细胞的分化分为以下 5 个阶段:

2.4.1 精细胞 I 期 细胞椭圆形,大小约为 $5\ \mu\text{m} \times 3.5\ \mu\text{m}$,核形与胞体一致,大小约为 $4\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$ 。核内细颗粒状染色质连成较大的团块状。染色质电子密度明显增大于次级精母细胞。胞质中线粒体较次级精母细胞期数量减少,体积增大,此时其直径约为 $0.6\ \mu\text{m}$ 。线粒体逐渐移向一侧,出现融合。胞质中有粗面内质网存在,高尔基体继续发育(图版 I:5)。

2.4.2 精细胞 II 期 细胞椭圆形,大小约为 3

$\mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$;核形椭圆,大小约为 $2 \mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$ 。核内电子密度进一步增大,染色质进一步浓缩,染色质团块继续增大,但仍为细小颗粒状。胞内电子密度较前期增加;线粒体融合为少数几个,嵴数显著增多变长;高尔基体小潴泡融合形成前顶体囊,前顶体囊内为均匀絮状物质,电子密度较高;中心粒移至线粒体一侧(图版 I:6)。

2.4.3 精细胞Ⅲ期 细胞及核均为椭圆形,核内染色质浓缩成较大的颗粒状,进一步均匀化。核浓缩,核质与胞质体积比相对减小;前顶体囊逐渐移至核的一侧,线粒体移至另一侧,高尔基体分泌的小潴泡继续融入前顶体囊(图版 I:9, 10)。

2.4.4 精细胞Ⅳ期 核形逐渐由椭圆拉长成柱状,并不断伸长;核质电子密度进一步增大,染色质为较大颗粒状,有少数较小电子透明区存在。胞质中的电子密度减小,核质与胞质的体积比进一步减小。前顶体囊继续发育,内为高电子密度的絮状物质;精子中段形成,线粒体嵌入植入窝中,中心粒位于核后窝,远端中心粒发出轴丝,形成尾部(图版 II:1,2)。

2.4.5 精细胞Ⅴ期 精细胞进一步拉长呈辣椒状,核内染色质粗颗粒均匀状,有较少的电子透明区存在(图版 II:4)。前顶体囊伸长,密度变小;在一些切面上看到前顶体靠核端呈罩状(图版 II:3)。此期细胞质大量排出。

2.5 成熟精子的超微结构 精细胞经过一系列形态变化,最终形成精子。成熟精子为长辣椒状,整体有一定弧度的弯曲,后有长长的鞭毛尾部(图版 II:5)。菲律宾蛤仔精子为初生型,由头部、中段和尾部组成。

头部由顶体和细胞核组成(图版 II:6)。顶体位于最前端,细长柱形,末端渐细,长度为 $3 \mu\text{m}$ 或者更长,电子密度小且均匀。细胞核位于顶体后,近锥形,长度约为 $3 \sim 4 \mu\text{m}$,最窄处约 $0.2 \mu\text{m}$,最宽处约为 $1 \mu\text{m}$,核质均匀,电子密度大,有少数核泡存在。过精子正中轴的纵切面上,细胞核前端有一浅的 V 型核前窝(图版 II:7)。在精子细胞核前端的横切面上,也可见核前窝存在(图版 II:9)。在非正中轴的精子的纵

切面上,顶体与核交界处非常平直,不见亚顶体腔。成熟精子核后端有植入窝和较小的核后窝。

中段由核后端的中心粒及线粒体环组成。近端中心粒植入核后窝中,与精子纵轴方向垂直,远端中心粒在它的后方,平行于精子纵轴方向,向尾部伸出轴丝(图版 II:8)。中段的线粒体环由 4 个相互靠近的线粒体组成,线粒体椭圆形,大小约为 $0.7 \mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$,嵴非常发达且排列规则。在中段横切面上,远端中心粒和线粒体环之间有一风车状的结构(图版 II:10)。

成熟精子尾部为鞭毛型,横切面圆形,直径约为 $0.2 \mu\text{m}$,外有小波浪状质膜包被,内有轴丝,为典型的“9+2”结构。

3 讨论

Walker 认为,动物精细胞演化为精子的过程中,染色质浓缩的形态有三种基本类型:颗粒状、纤维状和片层状^[12]。Willian 认为原生型精子核染色质大都是颗粒状,少数是纤维状^[13]。菲律宾蛤仔雄性生殖细胞核染色质形态演化顺序为:小颗粒组成的小团块状→小颗粒的较大团块状→较大颗粒均匀状→粗颗粒均匀状→致密均匀染色质。这与青蛤、波纹巴非蛤^[14]、文昌鱼^[15]以及三角帆蚌的演变过程类似,和 Walker 和 Willian 的观点是一致的。

不同种类精子形态结构的差异,主要是由其头部的不同造成。菲律宾蛤仔成熟精子呈长辣椒状,并有一定弧度的弯曲。其顶体细长,电子密度小,核呈现近圆锥形,顶体与核交界处直径约为 $0.2 \mu\text{m}$,很难得到其正中轴纵切面,难以直接观察是否存在亚顶体腔及核前窝结构。在极少数纵切面上(图版 II:7),观察到浅的锥形核前窝,在一些横切面上(图版 II:9),同心圆环状结构也证实了核前窝的存在。在很多双壳类的成熟精子中都存在亚顶体腔,如在贻贝^[7]、泥蚶^[16]、缢蛏^[17]等中都存在或大或小的亚顶体腔,在菲律宾蛤仔的精细胞Ⅴ期,前顶体结构曾出现“灯罩状”,此时存在有亚顶体腔,在精子发生的其它阶段以及成熟精子的结构中没有观

察到这种结构,可能是因为顶体相对较长而且较细、电子密度较小等原因造成该区域很难被正好切到,以此推断蛤仔成熟精子中也存在亚顶体腔,这种推测还需要进一步的研究证实。

双壳类软体动物精子中存在于精子中段中心体周围的辐射状电子密度致密物形成的结构称为中心体相关结构。Thielley 等^[18]指出这种结构位于核后窝处,作为近侧中心粒和核膜间的连接,这种结构在很多种类中如澳洲船蛆(*Bankia australis*)、节铠船蛆(*B. carinata*)、珠母贝(*Pinctada margaritifera*)中有过描述;Dorange 和 Pennec^[19]认为,卫星体结构是在远侧中心粒的基部,形成远端中心粒和质膜间的连接,而在珠母贝(*Pinctada*)的精子中观察到在远近中心粒周围都有相似结构。泥蚶精子中在远端中心粒周围存在这种辐射状结构。菲律宾蛤仔精子中段,观察到位于线粒体环中央和远端中心粒之间的辐射状风车结构(图版 II:10),这种结构由中央环及与其相连的 9 个杆状伸出构成,中央环直径约 100 nm,杆状伸出长接近 200 nm。这种风车状结构与描述的中心粒相关结构相似,但在位置上有所不同,它的相关知识还需要进一步探讨研究。此外,中段的线粒体之间或外围存在一些圆形颗粒,这在几种双壳贝类 *Nucula sulcata*^[20]、*Laternula limicola*^[21] 及青蛤等也曾发现,Anderson 等人证明这些颗粒是糖原颗粒,是精子运动和代谢的内在能源,它的代谢由精子内的淀粉磷酸化酶系控制。

Frank 对紫贻贝(*Mytilus edulis*)^[22]的研究认为,精细胞分化期间,高尔基体分泌的前顶体颗粒融合为前顶体囊,最后在核顶部发育为顶体,而且认为高尔基体的分泌与粗面内质网有关,粗面内质网的消失,致使高尔基体失去了物质来源,不可能再合成或分泌前顶体颗粒。菲律宾蛤仔的高尔基体最早发现在初级精母细胞中。在生殖细胞的发育过程中,高尔基体发育良好,分泌旺盛;管状或囊泡状的粗面内质网广泛分布。精细胞 II 期高尔基体分泌的大量潴泡融合形成前顶体囊,精细胞 III 期仍有高尔基潴泡的融入,但已看不到粗面内质网存在。这说

明,高尔基体的发育分泌与粗面内质网间有必然的联系,也为 Frank 的观点提供了新的证据。

参 考 文 献

- [1] Daniels E W. Ultrastructure of spermatozoa from the American oyster *Crassostrea virginica*. *Trans Am Microsc Soc*, 1971, **90**: 275 ~ 282.
- [2] Franzen A. Ultrastructural studies of spermatozoa in three bivalve species with notes on evolution of elongated sperm nucleus in primitive spermatozoa. *Gamete Res*, 1983, **7**: 199 ~ 214.
- [3] Hodgson A N, Bernard R T. A comparison of the structure of the spermatozoa and spermatogenesis of 16 species of *Patellid iimpet* (Mollusca, Bivalvia). *J Morph*, 1988, **195**: 205 ~ 223.
- [4] Hodgson A N, Bernard R T. Ultrastructure of the sperm and spermatogenesis of three species of Mytilidae (Mollusca, Bivalvia). *Gamete Res*, 1986, **15**: 123 ~ 135.
- [5] 沈亦平,张锡元.合浦珠母贝精子发生过程中的超微结构观察. *武汉大学学报*, 1993, **39**(6): 123 ~ 129.
- [6] 任素莲,王如才,王德秀.带孔扇贝精子超微结构的研究. *动物学杂志*, 1998, **28**(3): 387 ~ 391.
- [7] 李太武,苏秀榕,李春茂等.贻贝雄性生殖系统的组织学和超微结构. *动物学研究*, 1999, **20**(3): 168 ~ 171.
- [8] 郭延平,谈奇坤.三角帆蚌的精子发生. *动物学杂志*, 2002, **37**(11): 2 ~ 5.
- [9] 曾志南,李复雪.青蛤精细胞分化的超微结构研究. *海洋学报*, 1991, **13**(4): 547 ~ 551.
- [10] 何进金,齐秋贞,韦信敏等.菲律宾蛤仔幼虫食料和食性的研究. *水产学报*, 1981, **5**(4): 275 ~ 284.
- [11] 齐秋贞.菲律宾蛤仔的生活史. *水产学报*, 1987, **11**(2), 111 ~ 117.
- [12] Walker M H. *Comparative Spermatology*. New York: Academic Press, 1970, 383 ~ 391.
- [13] Willian L M. *Spermatogenesis and Sperm Function in Reproductive Biology of invertebrate*. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons Press, 1983, 275 ~ 319.
- [14] 赵志江,李复雪.波纹巴非蛤精子发生的超微结构. *台湾海峡*, 1992, **11**(3): 238 ~ 243.
- [15] 林加涵,陈细法,汪德耀.文昌鱼精子发生过程中的超微结构研究. *海洋与湖沼*, 1987, **18**(5): 432 ~ 436.
- [16] 孙慧玲,方建光,王清印等.泥蚶精子的超微结构. *水产学报*, 2000, **24**(4): 297 ~ 301.
- [17] 刘正琼,上官步敏,许振祖.缢蛭精子发生的超微结构. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1990, **29**(1): 81 ~ 84.
- [18] Thielley M, Weppe M, Herbaut C. Ultrastructure study of gametogenesis in the french Polynesian black pearl oyster *Pinctada margaritifera* (Mollusca, Bivalvia). *J Shellfish Res*,

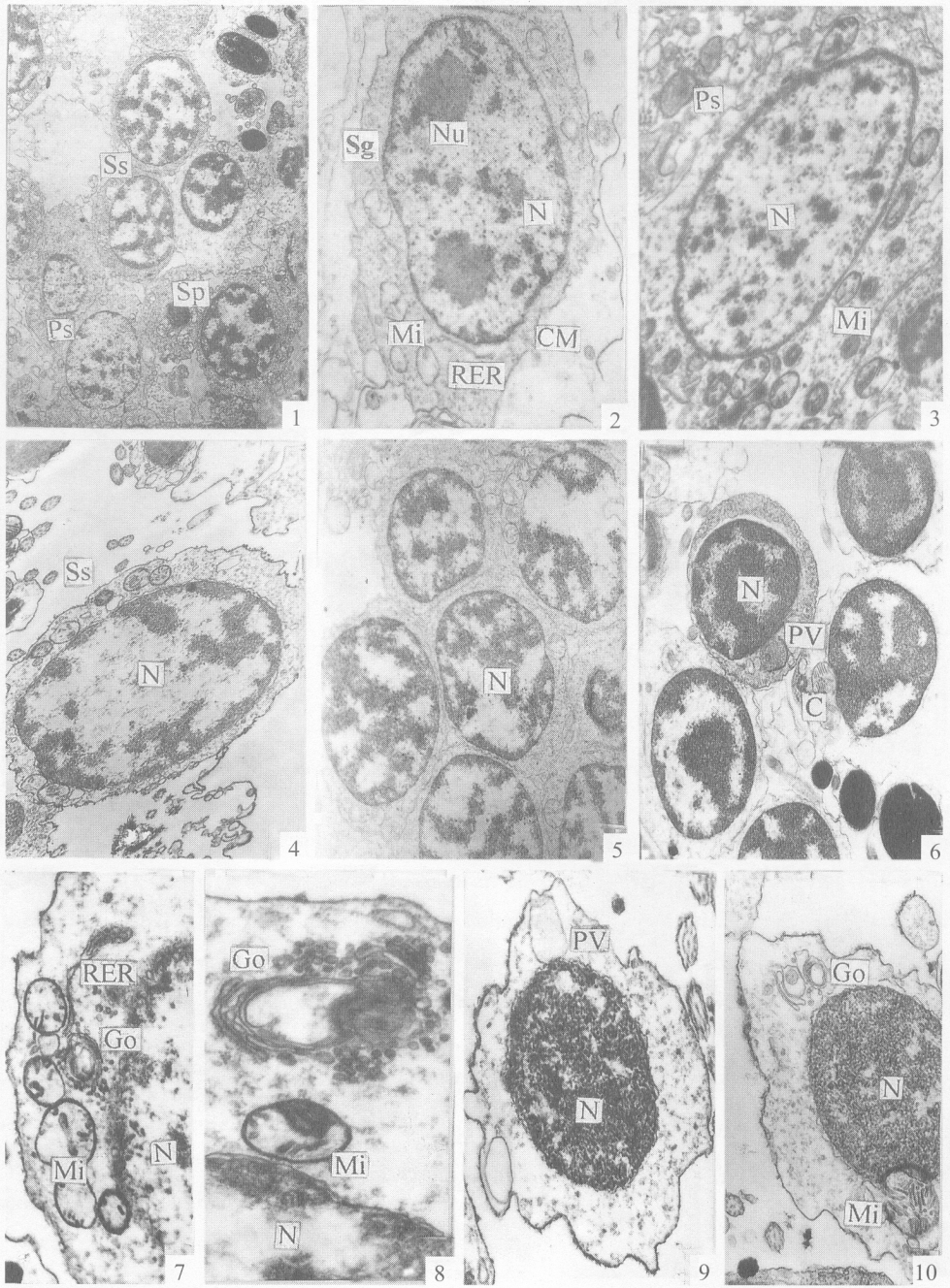
- 1993, 12(1): 41 ~ 47.
- [19] Drange G M, Pennec L. Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in *Pecten maximus* (Mollusca, Bivalvia). *Invert Reprod Dev*, 1989, 15(2): 109 ~ 117.
- [20] Longo F J, Dornfeld E J. The fine structure of spermatid differentiation in the mussel, *Mytilus edulis*. *J Ultrastr Res*, 1967, 20: 462 ~ 480.
- [21] Kudo M. The formation of a temporary acrosome in the spermatozoon of *Laternula limicola*. *J Ultrastr Res*, 1977, 61: 140 ~ 148.
- [22] Frank J L, Ernst J D. The fine structure of spermatid differentiation in mussel, *Mytilus edulis*. *J Ultrastr Res*, 1967, 20: 462 ~ 480.

代培芳等:菲律宾蛤仔的精子发生和精子超微结构

图版 I

DAI Pei-Feng *et al.*: Ultrastructural Studies on Spermatozoon and Spermatogenesis of *Ruditapes philippinarum*

Plate I



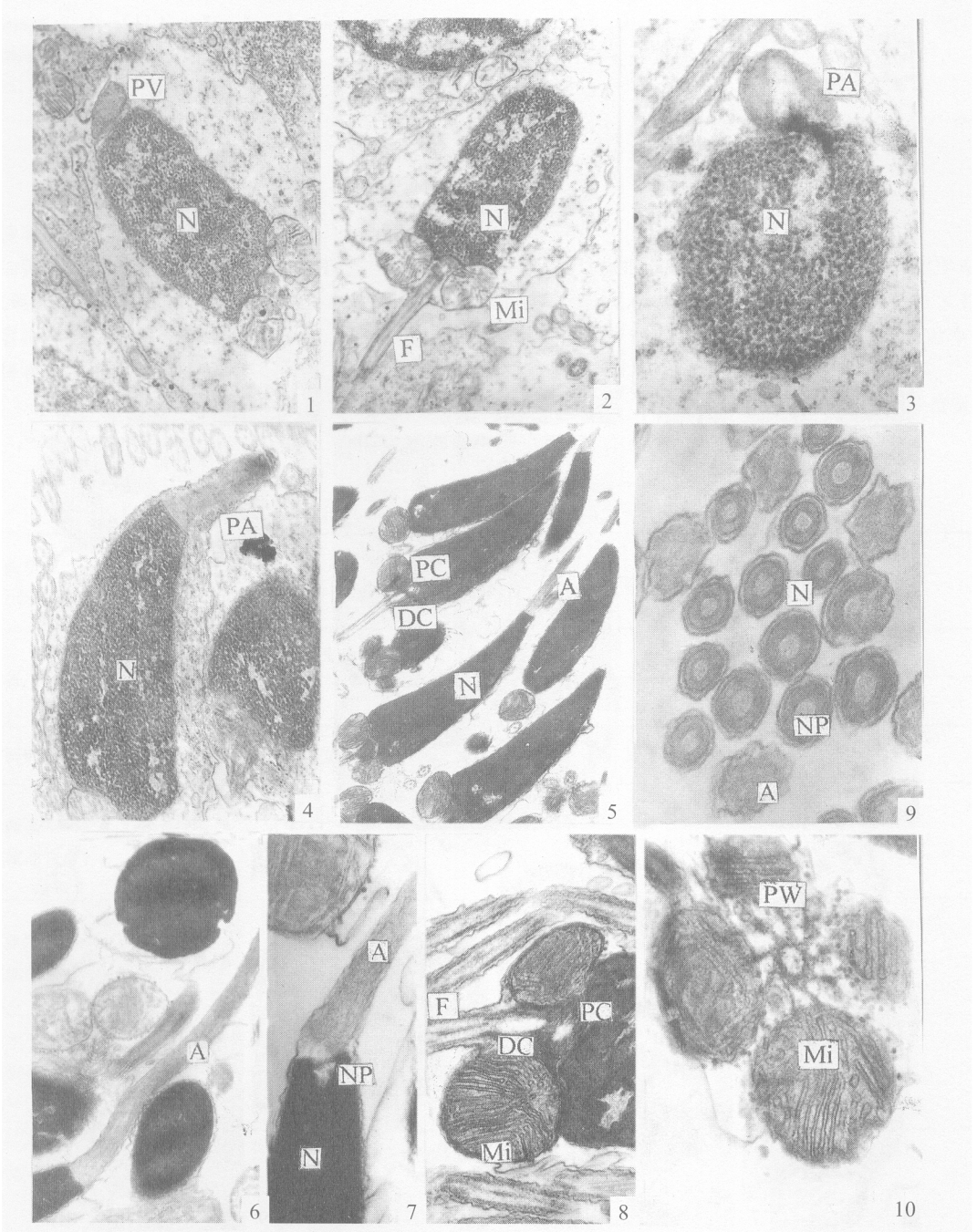
1. 部分不同发育阶段的生殖细胞 × 3 000; 2. 精原细胞 × 6 000; 3. 初级精母细胞 × 5 000; 4. 次级精母细胞 × 8 000; 5. 精细胞 I 期 × 6 000; 6. 精细胞 II 期 × 10 000; 7. 初级精母细胞的高尔基体 × 6 000; 8. 次级细胞的高尔基体 × 8 000; 9. 精细胞 III 期 × 10 000; 10. 精细胞 III 期的高尔基体 × 12 000

代培芳等:菲律宾蛤仔的精子发生和精子超微结构

图版 II

DAI Pei-Feng *et al.*: Ultrastructural Studies on Spermatozoon and Spermatogenesis
of *Ruditapes philippinarum*

Plate II



1. 精细胞IV期 × 10 000; 2. 精细胞IV期 × 10 000; 3. 精细胞V期 × 15 000; 4. 精细胞V期 × 15 000; 5. 成熟精子 × 8 000; 6. 顶体纵切 × 10 000; 7. 核前窝纵切 × 12 000; 8. 精子中段纵切 × 12 000; 9. 核前窝横切 × 50 000; 10. 精子中段横切 × 30 000

A: 顶体; C: 中心粒; CM: 细胞膜; DC: 远端中心粒; F: 鞭毛; Go: 高尔基体; Mi: 线粒体; N: 核; NP: 核前窝; Nu: 核仁; PA: 前顶体; PW: 风车状结构; PC: 近端中心粒; Ps: 初级精母细胞; PV: 前顶体囊; RER: 粗面内质网; Sg: 精原细胞; Sp: 精子; Ss: 次级精母细胞